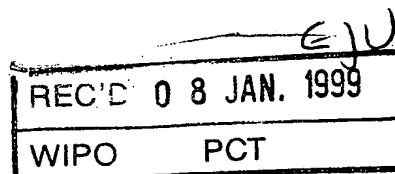


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

59/555 211  
EP 98/07682

## Bescheinigung

Die BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH in Ingelheim/  
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Messung der Apoptose" (

am 28. November 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 12 Q und G 01 N der Internationalen Patentklassifika-  
tion erhalten.

München, den 19. Oktober 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Zeichen: 197 52 922.4

Agurks

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

14.27.1998

Case 14/042 DI Fa/dc

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH  
55216 Ingelheim am Rhein (BRD)

Verfahren zur Messung der Apoptose

11.27.11.98

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet biologischer Testmethoden.

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ("programmed cell death", PCD) ist ein genetisch gesteuerter zellulärer Selbstmordmechanismus zur selektiven Aussonderung unerwünschter Zellen (1-4). PCD ist in einer Vielzahl biologischer Prozesse, einschließlich der Embryonal- und der Neural-Entwicklung, der Regulierung des Immunsystems, der Organogenese, der Gewebshomöostase und der Verhinderung von Erkrankungen wie Tumorstadium und Virusinfektion, ein unbedingt erforderlicher Prozeß. Apoptose ist gekennzeichnet durch Blasenbildung der Plasmamembran, Schrumpfen der Zellen, Kondensation des Kerns, endonukleolytische Spaltung von genomischer DNA in Fragmente internukleosomaler Länge sowie Ausbildung apoptotischer Körper.

Die zur Zeit verfügbaren Methoden zur Untersuchung der Apoptose beruhen auf der Beurteilung morphologischer Veränderungen auf zellulärer Ebene mittels Licht-, Elektronen- oder Zeitraffer-Mikroskopie in Verbindung mit Fluoreszenz-Vitalfarbstoffen, der Verwendung von Annexin V, mittels dem der Verlust der Membranphospholipid-Assymetrie während der Apoptose verfolgt werden kann (7), oder bestehen in Assays zum Nachweis der DNA-Fragmentierung mittels Gelelektrophorese (8) oder mittels *in situ* Markierung von DNA-Strangbrüchen („nick-end-Markierung“) (TUNEL) (9).

Um die Wirkung von Genen, die eine Rolle bei der Apoptose spielen, mittels transienter Transfektions-Analysen zu untersuchen, sind jedoch die meisten dieser

Methoden entweder ungeeignet oder, im Fall der TUNEL-Methode, zu teuer und zu aufwendig.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren zur Messung der Apoptose bereitzustellen, das die Nachteile der bekannten Methoden beseitigt.

Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren für die Messung der Apoptose gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist,

- A) daß man eine Population von Säugetierzellen transient transfiziert
  - ai) mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob sie bzw. das davon exprimierte Polypeptid eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung hat,
  - a ii) oder mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob bzw. durch welche Substanzen ihre pro- oder anti-apoptotische Wirkung bzw. die Wirkung des davon exprimierten Polypeptids modulierbar ist,
- b) und mit einem Plasmid, enthaltend eine für ein fluoreszierendes Markerprotein kodierende DNA,
- B) daß man die Zellen in einem geeigneten Nährmedium, gegebenenfalls in Gegenwart einer Testsubstanz, solange inkubiert, bis die interessierende DNA-Sequenz bzw. das exprimierte Polypeptid seine potentielle Wirkung auf die Apoptose ausgeübt hat,

11.27.11.00

- C) daß man die Zellen erntet und fixiert, so daß das fluoreszierende Protein in den Zellen verbleibt, während die bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente aus den Zellen diffundieren können,
- D) daß man mittels Messung des DNA-Gehalts den Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt,
- E) daß man mittels Messung der Zellen mit fluoreszierendem Markerprotein den Anteil der transfizierten Zellen bestimmt,
- F) und daß man durch Vergleich der in Schritt D und E erhaltenen Werte den Anteil der apoptischen Zellen in der transfizierten Subpopulation der Zellen bestimmt.

Unter die Bezeichnung „interessierende DNA-Sequenz“ (im folgenden auch als „Apoptose-Testgen“ bezeichnet) fallen sämtliche DNA-Sequenzen, die als solche oder deren translatierte Produkte direkt oder indirekt Apoptose beeinflussen. Beispiele für Apoptose stimulierende Gene sind p53, bax, E1A, Beispiele für Apoptose hemmende Gene sind bcl-2, bcl-x, E1B 19K, zur letzteren Gruppe zählen auch die sog. Überlebensfaktoren wie Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs). Derartige Apoptosegene und ihre Wirkung wurden in Übersichtsartikeln beschrieben (z. B. 4, 23, 24).

Bei dem Apoptose-Testgen kann es sich um bekannte oder unbekannte Gene oder Fragmente davon handeln. Unter Beeinflussung der Apoptose werden sowohl Induktion und Verstärkung als auch Blockierung und Abschwächung der Apoptose verstanden.

Die erfindungsgemäße Methode erlaubt eine große Variabilität, z.B. hinsichtlich der für die Bestimmung der transfizierten Zellen bzw. für die Apoptose verwendeten Marker, hinsichtlich der Plasmide und der für die Transfektion der Zellen eingesetzten Transfektions-Methode.

Die erfindungsgemäße Methode weist als eines ihrer wesentlichen Elemente ein fluoreszierendes Markerprotein auf, das als Nachweis für die transiente Transfektion der Zellen dient.

Bevorzugt ist als Markerprotein das Green Fluorescent Protein (GFP). GFP-Mutanten, die im Hinblick auf die FACS-Analyse optimiert und für die Anwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind literaturbekannt. Ein Beispiel für eine geeignete GFP-Mutante wurde in (10) beschrieben ("enhanced Green Fluorescent Protein", eGFP); es können jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch andere Mutanten verwendet werden, die die Bedingung erfüllen, daß sie den Zellmetabolismus nicht beeinflussen, daß sie intrazellulär lokalisiert bleiben und daß sie ein meßbares Fluoreszenzsignal liefern, insbesondere daß sie mittels derzeit gängiger fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie-Methoden (Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)) meßbar sind.

Außer dem Green Fluorescent Protein (GFP) können auch andere fluoreszierende Markerproteine verwendet werden. Beispiele dafür sind Blue Fluorescent Protein (BFP) (26) und Yellow Fluorescent Protein (YFP) (25). Wesentlich für die Eignung eines Markerproteins für die Verwendung in der erfindungsgemäßen Methode sind die oben für GFP-Mutanten angeführten Eigenschaften.

11.27.11.98

Potentielle Markerproteine sowie Art und Menge der im Assay einzusetzenden dafür kodierenden Plasmide sowie die am besten geeignete Transfektionsmethode können z.B. wie folgt getestet werden: die für die Markerproteine kodierenden Plasmide werden transient in Säugerzellen transfiziert, zweckmäßig in dieselben Zellen und unter denselben Bedingungen, mit denen die erfindungsgemäße Methode durchgeführt werden soll. Die Eignung der transfizierten Markerproteine wird durch Meßreihen ermittelt, in denen Transfektionseffizienz und die Effizienz der reproduzierbaren Meßbarkeit durch FACS-Analyse bestimmt werden.

Als Marker für die Apoptose dient ein DNA-bindender Farbstoff, z.B. Propidiumjodid (PI), der in der apoptotischen Subpopulation eine Verringerung der Fluoreszenz herbeiführt (14-17). Diese Nachweisweismethode beruht auf dem Prinzip, daß die genomische DNA in Zellen während der Apoptose endonukleolytisch abgebaut wird. Die kleinen DNA-Fragmente diffundieren aus der Zelle; die Verringerung des DNA-Gehalts auf weniger als den doppelten Chromosomensatz ("sub-2N") ist ein Kennzeichen apoptotischer Zellen.

Die verringerte Fluoreszenz von PI in Zellen, die Apoptose durchmachen, resultiert im Erscheinen eines charakteristischen Fluoreszenzpeaks („sub-2N-Peak“) im Bereich der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Region des Zellzyklus.

Statt Propidium-Jodid können auch andere DNA-bindende Farbstoffe verwendet werden. Vertreter geeigneter Farbstoffe dieses Typs sind kommerziell erhältlich, z.B. DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol), Acridinorange, Ethidiumbromid. Der am besten geeignete

M 27. 11. 90

Farbstoff kann ermittelt werden, indem Zellen zur Apoptose angeregt werden und anschließend mittels FACS- oder mikroskopischer Analyse ermittelt wird, ob Apoptose mit dem Farbstoff-Kandidaten reproduzierbar gemessen werden kann.

Einer der Vorteile der erfindungsgemäßen Methode besteht darin, daß die Messung der Fluoreszenz des Markerproteins und des DNA-Gehalts gleichzeitig erfolgen kann, vorzugsweise mittels FACS-Analyse. Geeignete Geräte sind im Handel erhältlich.

Die Erfindung ist auf sämtliche Säugerzellen anwendbar, die kultivierbar sind. Für den Fachmann ist es Routine, die handelsüblichen FACS-Geräte auf unterschiedliche Zelltypen einzustellen.

Für die Transfektion der Zellen mit Markergen einerseits und interessierendem Gen andererseits sind sämtliche Vektoren geeignet, die in Säugerzellen effizient und reproduzierbar Expression herbeiführen. Beispiele für die zahlreich zur Verfügung stehenden, auch kommerziell erhältlichen Vektoren, enthalten regulatorische Sequenzen mit der Fähigkeit, in einer Vielzahl von Säugerzellen hohe Expressionsraten zu erzielen. Beispiele sind Vektoren, die den CMV-(Cytomegalievirus), den SV40-(Simianvirus), MSV (Moloney Sarcoma Virus)-Promotor oder andere starke, zelltypenspezifische Promotoren enthalten.

Als Träger für Markergen und interessierendes Gen können identische oder verschiedene Vektoren verwendet werden; es kann in Abhängigkeit vom Zelltyp vorteilhaft sein, Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren zu verwenden, um eine Konkurrenz der Promotoren bei der Transkription zu vermeiden.



11.27.1998

Bezüglich der Transfektions-Methoden ist die Erfindung keinen Beschränkungen unterworfen; es können prinzipiell sämtliche für die transiente Transfektion von Säugetierzellen bekannten Methoden verwendet werden, z.B. Calciumphosphat, kommerziell erhältliche kationische Lipide wie Lipofectamin oder Transfectam, Methoden auf der Grundlage der rezeptorvermittelten, Adenovirus-unterstützten Endozytose, wie z.B. in der WO 93/0783 beschrieben, z.B. mittels Polyethylenimin und Psoralen/UV inaktiviertem Adenovirus, wie auch in (21) beschrieben. Die Transfektionsmethode kann mittels Reihenversuchen, in denen hinsichtlich Transfektionsbedingungen, Zelltyp, Nährmedium etc. variiert wird, optimiert werden, indem mit einem fluoreszierenden Markerprotein transfiziert und die Expression des Proteins mittels FACS-Analyse bestimmt wird. Die für das Markerprotein optimierten Bedingungen werden für die Co-Transfektion mit dem interessierenden Gen verwendet.

Im Anschluß an die Transfektion werden die Zellen in einem geeigneten Nährmedium, das an den jeweiligen Zelltyp angepaßt wird, inkubiert. Gegebenenfalls werden die Zellen zur Apoptose stimuliert, insbesondere wenn das Apoptose-Testgen auf eine Hemmung der Apoptose untersucht werden soll. Geeignete Apoptose Stimuli sind literaturbekannt und im Handel erhältlich, Beispiele dafür sind Staurosporin, Daunomycin, Etoposid. Die Inkubationsbedingungen sowie die Zweckmäßigkeit eines Apoptose-Stimulans werden in Vorversuchen ermittelt. Wesentlich für die Inkubation, insbesondere für deren Dauer ist, daß Apoptose in einem Ausmaß stattgefunden hat, welches ermöglicht, daß eine Änderung meßtechnisch, z.B. mittels FACS-Analyse, erfaßt werden kann.

Wesentlich für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der anschließend an die Inkubation vorgenommene Fixierungsschritt.

Wesentliche Anforderung an die Fixierung ist, daß die Bedingungen so gewählt werden, daß die bei der Apoptose entstehenden, kleinen subgenomischen DNA-Fragmente (internukleosomale Fragmente, d.h. solche mit einer Größe von ca. 200 bp und einem Vielfachen davon) aus den apoptotischen Zellen diffundieren können, gleichzeitig aber das fluoreszierende Markerprotein in der Zelle verbleibt. Bei den bisher verfügbaren Methoden war die Kombination dieser Messungen nicht möglich, weil die Anforderungen an die Fixierung im Hinblick auf Messung des fluoreszierenden Markerproteins einerseits und Messung des DNA-Inhalts der Zellen andererseits diametral entgegengesetzt waren und daher unvereinbar schienen. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es erstmals, mit Hilfe eines geeigneten Fixierungsschritts beide Messungen in derselben Zellpopulation durchzuführen.

Um die geeigneten Fixierbedingungen zu ermitteln, wird zweckmäßig wie folgt vorgegangen: Zunächst werden die einerseits für die Messung der Fluoreszenz des Markerproteins (starke Fixierung) und andererseits die für die Messung des DNA-Gehaltes der Zellen (möglichst schwache Fixierung) optimalen Fixierbedingungen unabhängig voneinander ermittelt. Ausgehend von den Bedingungen, mit denen die maximalen Meßwerte erhalten werden, werden die Fixierungsbedingungen hinsichtlich der Reagentien (Fixierungsreagens, Salze, Puffer), deren Konzentration sowie der Fixierungszeit so verändert, daß bei gleichzeitiger Vornahme beider

Meßvorgänge die Effizienz möglichst wenig beeinträchtigt wird.

Bevorzugt wird die Primärfixierung mit Paraformaldehyd und die anschließende Behandlung (Sekundärfixierung/Permeabilisierung) mit Ethanol durchgeführt; diese Behandlung hat sich im Rahmen der durchgeführten Versuche als am besten geeignet erwiesen. Die Vorfixierung mittels 1 bis 4 % (w/v), insbesondere 2 % Paraformaldehyd findet in einer isotonischen, gepufferten Salzlösung statt. Geeignet sind z.B. Standardlösungen wie 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM Saccharose sowie handelsübliche physiologisch verträgliche Puffer.

Statt Paraformaldehyd können auch andere Reagenzien, wie sie üblicherweise, z.B. in der Immunhistochemie, eingesetzt werden verwendet werden. Beispiele für gängige Fixiermittel, die einschlägigen Handbüchern (27) entnommen werden können, sind Formaldehyd oder Chloroform/Aceton.

Statt Ethanol, das sich unter den in den durchgeführten Versuchen gewählten Bedingungen für die Sekundärfixierung im Anschluß an die Primärfixierung mit Paraformaldehyd als besonders geeignet erwiesen hat, können grundsätzlich andere Reagentien, die eine schwache Permeabilisierung der Zellmembran ermöglichen, verwendet werden, wie z.B. Detergentien.

Die transiente Expression von Genen, die Apoptose modulieren, zum Beispiel Bcl-Familienmitglieder oder Komponenten der Überlebensfaktor-Signaltransduktion, und die anschließende quantitative Analyse der Apoptose mittels der erfindungsgemäßen Methode erlauben es, chemische Verbindungen darauf zu testen, ob sie in der

Lage sind, spezifisch die Funktion der Apoptose-modulierenden Gene zu beeinflussen.

Die erfindungsgemäße Methode kann durch entsprechende apparative Anpassungen, z.B. der Probenpräparation und der FACS-Analyse, automatisiert werden, was sie für Messungen im großen Maßstab, z.B. in High Throughput Screening-Methoden geeignet macht.

Die Methode in dieser Form findet Anwendung bei der Identifizierung pharmazeutisch wirksamer Substanzen, die Apoptose in Abhängigkeit der Expression bestimmter Gene (Apoptose-Testgene) modulieren können. Dabei wird das Gen, dessen Wirkung auf Apoptose durch die Testsubstanz moduliert werden soll, transient in Testzellen transfiziert und die Testzellen mit einer Vielzahl von Substanzen inkubiert. Die modulierende Wirkung einer Testsubstanz auf die Aktivität des Testgens wird direkt meßtechnisch erfaßt.

Derartige Methoden können für folgende Screening-Anwendungen eingesetzt werden:

a) Suche nach Inhibitoren von Überlebensfaktoren und ihrer Signaltransduktion, sowie Inhibitoren von anti-apoptotischen Genprodukten in Tumorzellen; b) Suche nach Chemikalien, die in Tumorzellen synergistisch mit Chemotherapie bestimmte Überlebensfaktoren und ihre Signaltransduktion inhibieren; c) Suche nach Chemotherapeutika, die mit der Inhibierung von Überlebensfaktoren synergistisch wirken.

Ferner können mit der erfindungsgemäßen Methode bekannte Gene daraufhin untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß sie Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen modulieren.

Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Methode ist die Expressionsklonierung von Genen, die Apoptose modulieren. Dafür wird eine komplette cDNA-Expressionsbibliothek transient in Zellen transfiziert. Die erfindungsgemäße Methode ist in der Lage, den Einfluß von Genexpression innerhalb 24 bis 48 Stunden zu messen. Es ist daher möglich, Zellen zu analysieren und noch lebend zu isolieren. Für diese Anwendung wird eine Modifikation der Methode vorgenommen, indem Einzelzellen, die von einem zu bestimmenden Apoptosehintergrund abweichen, durch FACS-Sortierung isoliert werden. Die in diese Zellen transfizierten Plasmide werden isoliert, amplifiziert und in weiteren Transfektionsrunden selektioniert. Plasmide, die ein Apoptose-modulierendes Gen enthalten, werden auf diese Weise isoliert. Die entsprechenden Gene werden dann durch Sequenzierung und weitere Expressions- und Funktionsstudien charakterisiert.

Um die erfindungsgemäße Methode zu validieren, wurden im Beispiel 1 zunächst etablierte Tumorzelllinien verwendet, die einerseits mit einem GFP-Plasmid, und andererseits mit einem Plasmid, enthaltend eine pro-apoptotische oder eine anti-apoptotische Gensequenz, oder einem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. Anschließend an die Transfektion wurden die Zellen nach einer Ruhepause mit einem apoptotischen Stimulus behandelt (Kontrollzellen blieben unbehandelt). Anschließend wurden die abgelösten Zellen gesammelt und mit den trypsinierten adherenten Zellen vereinigt, gewaschen und fixiert. Nach dem anschließenden Waschen wurden die Zellen geteilt, um einen Vergleich der erfindungsgemäßen Methode mit der herkömmlichen TUNEL-Methode, die flureszierendes Cy5-dCTP (5-Amino-propargyl-2'-Deoxycytidin 5'-

11.22.1990

Triphosphat gekoppelt an Cy5 Fluoreszenzfarbstoff )  
verwendet, zu ermöglichen.

Es zeigte sich, daß die erfindungsgemäße Methode verläßlich den erwarteten pro- oder anti-apoptotischen Effekt der Genprodukte nachweist und daß der Zusatz des apoptotischen Stimulus den beobachteten Effekt verstärkt. Wenngleich die Empfindlichkeit der erfindungsgemäßen Methode unter den gewählten Bedingungen etwas geringer war als die der TUNEL-Methode, war der normalisierte Apoptose-Wert, ausgedrückt als das Verhältnis der mit dem pro-apoptotischen Gen erzielten maximalen Apoptosewerte des jeweiligen Assays, nahezu identisch. Gegenüber der TUNEL-Methode weist die erfindungsgemäße Methode den Vorteil der Schnelligkeit, Einfachheit und Billigkeit auf.

Die breite Anwendbarkeit sowie Verläßlichkeit der erfindungsgemäßen Methode wurde durch Verwendung einer nicht-transformierten Ratten-Fibroblasten-Zelllinie, die weniger auf apoptotische Stimuli reagiert als die etablierten Tumorzelllinien, bestätigt.

Die erfindungsgemäße Methode ermöglicht es, rasch, wirkungsvoll und reproduzierbar die potentielle Rolle eines Genprodukts in der Apoptose festzustellen.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt einen Kit zur einfachen und routinemäßigen Durchführung des Verfahrens.

Ein solcher Kit enthält zweckmäßig in mehreren getrennten Behältern folgende Komponenten:

- a) eine oder mehrere für die Transfektion erforderliche Komponenten;
- b) ein Plasmid, enthaltend die für das fluoreszierende Markerprotein kodierende Sequenz;
- c) einen Leervektor für die Inserierung der interessierenden DNA Sequenz sowie für Kontrollmessungen;
- d) die Primärfixierlösung, z.B. Paraformaldehyd-Lösung;
- e) die Nachfixier/Permeabilisierungslösung, z.B. 70 % Ethanol;
- f) Waschlösung(en);
- g) einen DNA-bindenden Farbstoff.

Vorzugsweise enthält der Kit als Transfektionskomponenten Polyethylenimin und Psoralen/UV- inaktiviertes Adenovirus.

## Beispiel 1

Für dieses Beispiel wurden etablierte Tumorzelllinien ( $\beta$ TC und  $\beta$ HC) verwendet, die von  $\beta$ -Zell-Tumoren (15) transgener Mäuse stammen, in denen die regulatorische Region des Insulin-Gens (Rip) die Expression des großen T-Antigens von Simianvirus 40 (Tag) in den  $\beta$ -Zellen pankreatischer Inseln spezifisch induziert (16).

Ca. 80.000 Zellen wurden in eine Vertiefung von 6 cm einer Kulturschale mit 6 Vertiefungen gesät und in DMEM, ergänzt mit 10 % FCS (v/v), 2 mM Glutamin, 100 internationalen Einheiten Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, bis zu einer Konfluenz von 70 % gezüchtet. Die Zellen wurden mit 1  $\mu$ g eines Plasmids, kodierend für eGFP („enhanced GFP“; pEGFP-C1; Clontech)

11.27.1990

zusammen mit 1 µg eines Kontrollplasmids (pMEX; (22)), eines pCMV-Plasmids, enthaltend das pro-apoptotische Adenovirus-Gen E1A oder eines pCMV-Plasmids, enthaltend das anti-apoptotische Adenovirus-Gen E1B-19K (17, 18) unter Verwendung von 10 µl LipofectAMINE (GIBCO-BRL) nach Empfehlung des Herstellers transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen 16 h in komplettem Medium ruhen gelassen, anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder mit einem apoptotischen Stimulus (800 ng/ml Staurosporin; Sigma) (19, 20) während weiterer 16 h behandelt. 32 h nach der Transfektion wurden die abgelösten Zellen mit trypsinierten, adherenten Zellen vereinigt, zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur während 30 min fixiert (2 % Paraformaldehyd, 100 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure), 10 mM PIPES (piperazine-N<sub>1</sub>N<sup>1</sup>-bis[z-ethane sulfonic acid]) pH 6.8). Dann wurde zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und 14 h lang in eiskaltem 70 % EtOH nachfixiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und geteilt. Eine Hälfte der Probe wurde mit RNase A (Sigma, St. Louis, USA) (50 µg/ml) in PBS während 30 min behandelt, zweimal mit 4 ml PBS gewaschen und 30 min vor der FACS-Analyse mit Propidiumjodid in PBS (PI; 50 µg/ml; Sigma, St. Louis, USA) gefärbt. Die andere Hälfte der Probe wurde mit 50 µl TdT-Reaktionsmischung (terminale Desoxynukleotidyltransferase; Boehringer Mannheim; 200 mM Kaliumkaskodylat, 25 mM Tris-HCl pH 6.6, 0.25 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 mM CoCl<sub>2</sub>; 0.25 nmol FluoroLink Cy5AP3-dCTP [Amersham], 12.5 Einheiten TdT) 1 h lang bei 37°C inkubiert, zweimal mit 4 ml PBS gewaschen, mit RNase in PBS (50 µg/ml) während 30 min



M 27.11.98

behandelt, zweimal mit 4 ml HBS gewaschen (ab diesem Schritt wurde statt PBS HBS verwendet, weil DAPI in PBS dazu neigt, Mikropräzipitate zu verursachen), mit DAPI in HBS (10 µg/ml; Sigma) während 20 min gefärbt und auf einem Becton Dickinson FACS Vantage Gerät analysiert. Die FACS Analyse der PI-gefärbten Zellen wurde mit einem Becton Dickinson FACScan Gerät durchgeführt, das mit einem sog. "doublet discrimination module" ausgestattet ist, mit dem Zellaggregate mittels Berechnung der Pulsweite und Pulsweite diskriminiert werden. Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 1 dargestellt. Fig. 1A zeigt die Anzahl der apoptotischen  $\beta$ Hc 13T Tumorzellen (% Apoptose) in der gesamten eGFP-positiven Zellpopulation. Die schwarzen Balken zeigen die Bestimmung des sub-2N DNA Gehalts (GFP/PI); die weißen Balken den Einbau von fluoreszentem Cy5AP3-dCTP während der TdT-Reaktion (GFP/TUNEL). Die Zugabe von Staurosporin ist angegeben. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm für eGFP und PI, eine Anregungswellenlänge von 647 nm für Cy5 und UV eines Wellenlängenbereichs von 51 - 364 nm für DAPI verwendet. Die Emissionsfluoreszenz wurde unter Verwendung eines 530/20 nm Schmalbandfilters für eGFP, eines 610 nm Sperrfilters für PI, eines 675/20 nm Schmalbandfilters für Cy5 und eines 424/44 Schmalbandfilters für DAPI gesammelt. Dupletten wurden mittels gepulster Prozessierung ausgeschlossen. eGFP-exprimierende Zellen wurden ausgewählt und auf Cy5- oder PI-Fluoreszenz analysiert. Die Daten wurden unter Verwendung der CELLQuest-Software (Becton Dickinson) analysiert. Jeder Balken stellt den Durchschnitt von 3 Transfektionen dar, Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angezeigt. Jede Messung umfaßte 40.000 Gesamtereignisse, ausgewählt nach Größe und Einzelzellen. Die Transfektionseffizienz betrug 20-30 %.

Fig. 1B zeigt den normalisierten Prozentsatz der Apoptose für die verschiedenen Konstrukte. Apoptoseindex wurde unter Verwendung folgender Funktion normalisiert:  $(\% \text{ Apoptose in X} / \% \text{ Apoptose in eGFP-C1/E1A}) \times 100$ . Der apoptotische Index wurde für jede der verwendeten Nachweismethoden und für jede Nach-Transfektionsbehandlung (+/- Staurosporin) normalisiert.

## Beispiel 2

In diesem Beispiel wurde einer nicht-transformierte Ratten-Fibroblasten-Zelllinie der Bezeichnung Rat1A verwendet. Die Zellen wurden transient transfiziert, wobei entweder, wie in Beispiel 1 beschrieben, LipofectAMINE oder Polyethylenimin(PEI 2000)-DNA-Adenovirus-Komplexe (WO 93/0783) verwendet wurden. Im übrigen wurde hinsichtlich Behandlung der Zellen und Bestimmung der Apoptose mittels erfindungsgemäßem Verfahren einerseits und TUNEL-Methode andererseits genauso vorgegangen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Der Vergleich der verschiedenen Transfektionsmethoden und Apoptose-Meßmethoden ist in der Tabelle dargestellt. Jeder Wert stellt den Durchschnitt von 3 Transfektionen dar; die Standardabweichung ist angegeben (s.d.). Die Effizienz beider Transfektionsmethoden betrug 25-30 %.

M 27.11.98

Tabelle

Transfi- ziertes Konstrukt	LipofectAMINE			
	Propidium Jodid		TUNEL	
	% Apoptose (s.d.)	% Apoptose normalisiert	% Apoptose (s.d.)	% Apoptose normalisiert
pMEX (Ctr)	3.3 (0.7)	68.8	6.5 (0.6)	71.4
pE1B-19K	1.4 (0.3)	29.2	2.2 (0.5)	24.2
pE1A	4.8 (0.4)	100	9.1 (2.6)	100
	PEI / Adeno			
pMEX (Ctr)	1.2 (0.2)	52.2	7.5 (0.3)	52.1
pE1B-19K	0.7 (0.1)	30.4	5.2 (0.8)	36.1
pE1A	2.3 (0.6)	100	14.4 (2.7)	100

Literatur

1. Korsmeyer, S. J. (1995) *Trends Genet*, **11**(3), 101-105.
2. Chinnaiyan, A. M. and Dixit, V. M. (1996) *Current Biology*, **6**(5), 555-562.
3. Vaux, D. L. and Strasser, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(6), 2239-2244.
4. White, E. (1996) *Genes Dev*, **10**(1), 1-15.
5. Kerr, J. F. R., Gobé, G. C., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. (1995) In Schwartz, L. M., and Osborne, B. A. (eds.), *Cell Death*. Academic Press, Inc., San Diego, Vol. **46**, pp. 1-27.
6. McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K. and Green, D. R. (1995) In Schwartz, L. M., and Osborne, B. A. (eds.), *Cell Death*. Academic Press, Inc., San Diego, Vol. **46**, pp. 153-185.
7. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and van Oers, M. J. (1994) *Blood*, **84**(5), 1415-1420.
8. Wyllie, A. H. (1980) *Nature*, **284**, 555-556.
9. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992) *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
10. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) *Gene*, **173**, 33-38.
11. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) *J Immunol Meth*, **139**, 271-279.
12. Telford, W. G., King, L. E. and Fraker, P. J. (1991) *Cell Prolif*, **24**, 447-459.

13. Telford, W. G., King, L. E. and Fraker, P. J.  
(1992) *Cytometry*, **13**(2), 137-143.
14. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G.,  
Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P. and  
Traganos, F. (1992) *Cytometry*, **13**(8), 795-808.
15. Radvanyi, F., Christgau, S., Baekkeskov, S.,  
Jolicoeur, C. and Hanahan, D. (1993) *Mol Cell  
Biol*, **13**, 4223-4232.
16. Hanahan, D. (1985) *Nature*, **315**, 115-121.
17. White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P. and Denton,  
A. (1991) *J Virol*, **65**, 2968-2978.
18. White, E. and Cipriani, R. (1990) *Mol Cell Biol*,  
**10**, 120-130.
19. Jacobsen, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. (1996) *J  
Cell Biol*, **133**, 1041-1051.
20. Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles,  
H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993)  
*Science*, **262**, 695-700.
21. Baker, A., et al., (1997) *Gene Therapy*, **4**, 773-782
22. Martin-Zanca, D., et al., (1989) *Mol. Cell. Biol.*  
**9**, 24-33
23. Reed, J.C. (1997) *Nature*, **387**, 773-776
24. Villa, P., Kaufmann, S.H. und Earnshaw, W.C.,  
(1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 388-393
25. Ormo, M., et al., (1996) *Science*, **273**, 1392-1395
26. Living Colors pEBFP Vector (1997) *CLONTECHniques*,  
**XII**, 16-17
27. Light microscopy biology a practical approach.  
Alan J. Lacey (Hrsg.), IRL Press 1989, Kap. 4,  
103-136

# Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Messung von Apoptose, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - A) eine Population von Säugetierzellen transient transfiziert
    - ai) mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob sie bzw. das davon exprimierte Polypeptid eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung hat,
    - aii) oder mit einem Plasmid, enthaltend eine interessierende DNA-Sequenz, von der bestimmt werden soll, ob bzw. durch welche Substanzen ihre pro- oder anti-apoptotische Wirkung bzw. die Wirkung des davon exprimierten Polypeptids modulierbar ist,
  - b) und mit einem Plasmid, enthaltend eine für ein fluoreszierendes Markerprotein kodierende DNA,
- B) die Zellen in einem geeigneten Nährmedium solange inkubiert, bis die interessierende DNA-Sequenz bzw. das exprimierte Polypeptid seine potentielle Wirkung auf die Apoptose ausgeübt hat,
- C) die Zellen erntet und fixiert, so daß das fluoreszierende Protein in den Zellen verbleibt, während die bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente aus den Zellen diffundieren können,

M 27.11.98

- D) mittels Messung des DNA-Gehalts den Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt,
  - E) mittels Messung der Zellen mit fluoreszierenden Markerprotein den Anteil der transfizierten Zellen bestimmt,
  - F) und durch Vergleich der in Schritt D und E erhaltenen Werte den Anteil der apoptischen Zellen in der transfizierten Subpopulation der Zellen bestimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Transfektion der Zellen mit Polyethylenimin und inaktiviertem Adenovirus durchführt.
  3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das in A b) definierte fluoreszierende Polypeptid das Green Fluorescent Protein ist.
  4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den DNA-Gehalt mit einem DNA-bindenden Farbstoff mißt.
  5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff Propidiumjodid ist.
  6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inkubation gemäß Schritt B) in Gegenwart einer Testsubstanz vornimmt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inkubation gemäß Schritt B) in Gegenwart einer Substanz vornimmt, die Apoptose stimuliert.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primärfixierung in Schritt C mit Paraformaldehyd und die Sekundärfixierung/Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol vorgenommen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt D und E definierten Messungen in einem Schritt mittels fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie-Analyse durchgeführt werden.
10. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er in mehreren getrennten Behältern folgende Komponenten enthält:
  - a) eine oder mehrere für die Transfektion erforderliche Komponenten;
  - b) ein Plasmid, enthaltend die für das fluoreszierende Markerprotein kodierende Sequenz;
  - c) einen Leervektor für die Inserierung der interessierenden DNA-Sequenz sowie für Kontrollmessungen;
  - d) die Primärfixierlösung;
  - e) die Sekundärfixier/Permeabilisierungslösung;



M 27.11.98

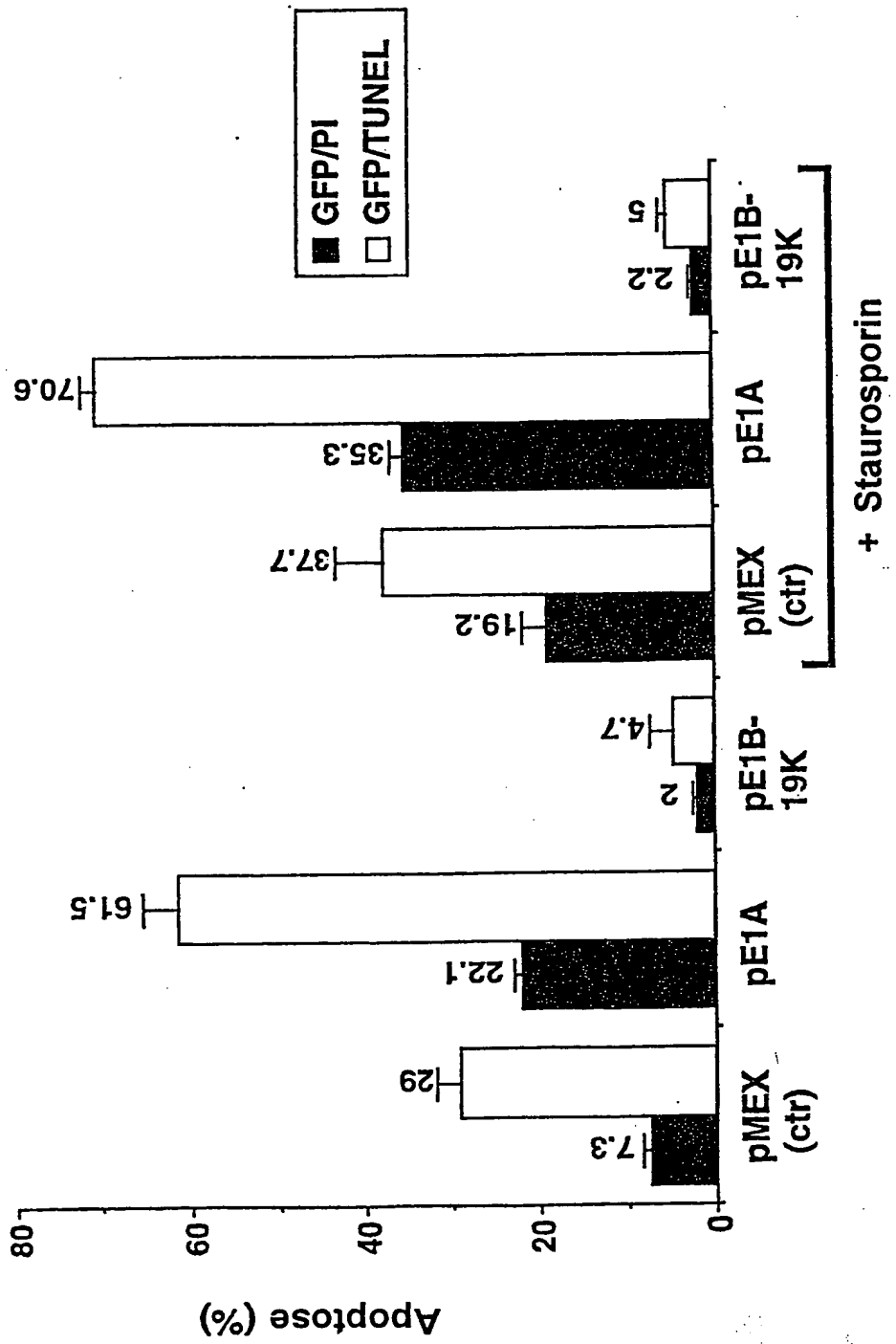
- f) Waschlösung(en);
  - g) einen DNA-bindenden Farbstoff.
- 
- 11. Kit nach Anspruch 10, enthaltend als Komponente a) Polyethylenimin und Psoralen/UV-inaktiviertes Adenovirus.
  - 12. Kit nach Anspruch 10, enthaltend als Komponente b) ein für Green Fluorescent Protein kodierendes Plasmid.
  - 13. Kit nach Anspruch 10, enthaltend als Komponenten d) eine ca. 2%ige Paraformaldehydlösung und als Komponente e) ca. 70 % Ethanol.
  - 14. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 zum Identifizieren von Substanzen, welche die pro- oder anti-apoptotische Wirkung von Genen oder Genprodukten modulieren.

## Zusammenfassung

Verfahren zur raschen und einfachen Messung der Apoptose. Säugetierzellen werden co-transfiziert mit einem Plasmid, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und mit einem Plasmid, das ein interessierendes Gen trägt. Nach Inkubation und milder Fixierung wird die Apoptose gemessen, indem mittels DNA-bindendem Farbstoff der DNA-Gehalt der Zellen sowie mittels Durchflußzytometrie der Anteil der transfizierten Zellen bestimmt wird.

M 27.11.98

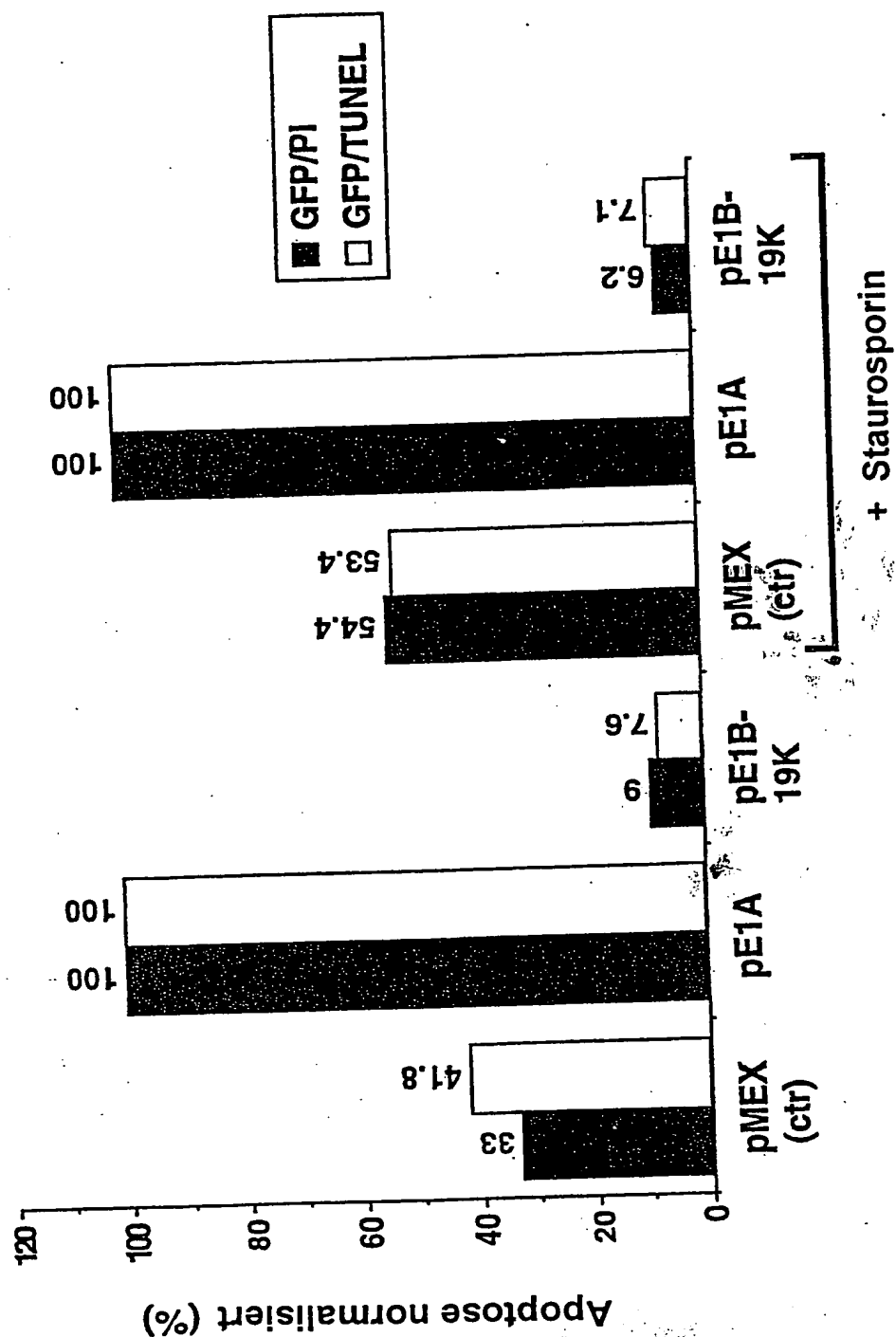
Fig. 1 A



A

M 27 18 08

Fig. 1 B



B